

Trabajo Fin de Grado

# **Metodologías analíticas para la monitorización ambiental**

Grado en Farmacia

Tutora: Verónica Pino Estévez  
Cotutora: Priscilla Rocío Bautista

**John William Bray**

**Curso 2016/2017**



## Agradecimientos

*En primer lugar, me gustaría darles las gracias a mis tutoras, Dra. Veronica Pino Estévez y Priscilla Rocío Bautista por su apoyo constante a lo largo del trabajo. También quisiera agradecer al Dr. Juan H. Ayala Díaz y la Dra. Ana M. Afonso y al resto del departamento por las palabras de ánimo con este trabajo.*

*Gracias también a los compañeros del laboratorio de al lado: Idaira, Mari José, Provi y Mario, por resolver todas mis dudas con una sonrisa y una canción cada mañana.*

*A mis amigos y, sobre todo, a mi familia; sin vuestra ayuda y apoyo constante no habría sido posible llegar hasta aquí. ¡Gracias!*

## Abstract

Polychlorinated biphenyls are highly persistent compounds that are commonly found in the environment. Nowadays, the use of PCBs is restricted due to their proven relation to different types of cancer, neurodegenerative problems and immunitary deficiencies, but because of their persistence it is still important to have a series of environmental monitorization methods for them.

This essay develops and validates a microextractive method, specifically head space solid phase microextraction combined with gas chromatography, for an unequivocal quantitative analytic determination of polychlorinated biphenyls in water samples. The technique ensures high preconcentration levels (and by such, an adequate sensitivity) and is distinguished by its efficiency and reproducibility.

The parameters that were optimized in the preconcentration phase were: nature of the fiber needed for the microextraction, the influence of the ionic medium in the analyzed water sample, extraction time and desorption time. The method was adequately validated for precision, extractive efficiency and detection and quantification limits.

## Resumen

Los bifenilos policlorados son compuestos de elevada persistencia en el medio natural. Hoy día su uso está muy restringido por su demostrada relación con distintos tipos de cáncer, problemas neurodegenerativos e insuficiencias inmunitarias, pero dada su persistencia es aún necesario la existencia de metodologías de monitorización medioambiental de los mismos.

Este trabajo desarrolla y valida una técnica microextractiva, concretamente la microextracción en fase sólida de espacio en cabeza, en combinación con cromatografía de gases, para la determinación analítica cuantitativa e inequívoca de bifenilos policlorados en muestras de agua. La técnica asegura altos niveles de preconcentración (y por tanto una adecuada sensibilidad), y se distingue por su eficacia y reproducibilidad.

Los parámetros optimizados en la etapa de microextracción fueron: naturaleza de la fibra necesaria en microextracción, influencia del medio iónico de la muestra acuosa analizada, tiempo de extracción y tiempo de desorción. Se validó adecuadamente la metodología en términos de precisión, eficacia extractiva y límites de detección y cuantificación.

# ÍNDICE

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Microextracción en fase sólida .....	1
1.2. Bifenilos Policlorados .....	3
1.3. Determinación analítica .....	7

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS .....	11
-----------------------------	----

## CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. Materiales .....	15
3.2. Instrumentación .....	18
3.3. Procedimientos .....	19

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Método cromatográfico .....	23
4.2. Optimización de la metodología de HS-SPME .....	25
4.2.1. Selección de la fibra .....	25
4.2.2. Efecto de la fuerza iónica .....	26
4.2.3. Influencia del tiempo de extracción .....	27
4.2.4. Influencia del tiempo de desorción .....	28
4.3. Validación de la metodología de HS-SPME-GC-MS.....	30
4.3.1. Calibración con el método total HS-SPME-GC-MS .....	30
4.3.2. Reproducibilidad del método total HS-SPME-GC-MS.....	32
CONCLUSIONES.....	35

GLOSARIO .....	37
BIBLIOGRAFÍA .....	39

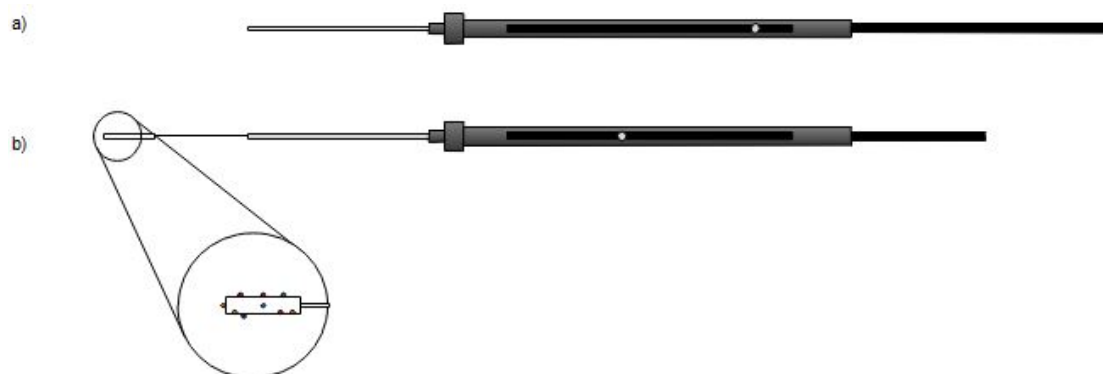
# Capítulo 1: Introducción

---

## 1. Introducción

### 1.1. Microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida (SPME) es un método analítico que permite una preparación rápida de muestras acuosas. Fue desarrollada por Pawliszyn, quien describió el fundamento teórico en 1989 [1]. Esta metodología se basa en la utilización de una fase estacionaria activa ligada a un soporte sólido, de apenas un centímetro de longitud en la mayoría de los casos [2]. Esta técnica se caracteriza por su simplicidad y rapidez, pues se basa en el contacto entre la muestra (o su espacio en cabeza) y la microfibras, asegurando asimismo altos factores de preconcentración, requiriendo pequeños volúmenes de muestra y, además, con la ventaja adicional de reutilización de las microfibras. El uso de SPME conjuntamente con cromatografía de gases elimina completamente el uso de disolventes orgánicos del proceso analítico (gracias a la desorción térmica) y además permite la automatización [3]. En figura 1.1., se muestra un sistema comercial de fibras de SPME.



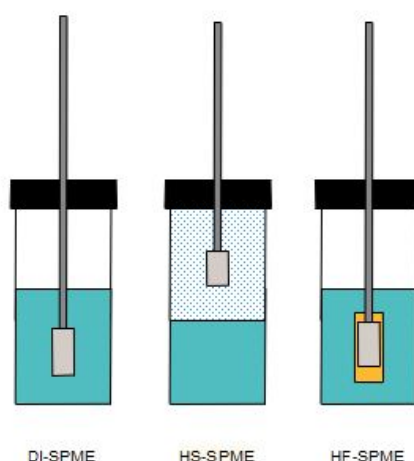
**Figura 1.1.** a) Fibra no expuesta, ensamblada en un dispositivo comercial y b) expuesta, en la que se aprecia la retención de analitos en la fase estacionaria.

Este tipo de dispositivos para SPME consiste en el uso de una fibra de sílice fundida, recubierta de una fase extractora o fase estacionaria, generalmente de naturaleza polimérica, capaz de extraer analitos polares y no polares de matrices de diferente naturaleza. En la Figura 1.2. se muestran distintos modos para desarrollar una metodología basada en SPME:



## Introducción

- DI-SPME (Direct immersion solid-phase microextraction): la fibra se sumerge directamente en el vial que contiene la muestra, generalmente siendo necesaria agitación magnética. Es adecuada para muestras acuosas y gaseosas.
- HS-SPME (Headspace solidphase microextraction): el analito se extrae del espacio que está encima de la muestra tras un calentamiento previo para volatilizar el analito. Así, la fibra no entra en contacto con la muestra, pudiéndose analizar muestras sólidas. Los analitos han de ser necesariamente volátiles o semi-volátiles.
- HF-SPME (Hollow fiber solidphase microextraction): la fibra se recubre de una membrana semipermeable que la protege de compuestos de alto peso molecular y posible materia particulada y se sumerge directamente en la muestra. Esta modalidad



es válida para analizar muestras con elevado contenido en materia orgánica.

**Figura 1.2.** Esquema de los distintos modos en SPME

Los mecanismos que justifican la microextracción de los analitos por parte de la fase estacionaria de la fibra puede ser de dos tipos: absorción o adsorción, según el tipo de recubrimiento de la misma [4].

Una de las limitaciones que presenta esta técnica es el reducido número de recubrimientos comerciales que se encuentran actualmente en el mercado. En la Tabla 1.1., se muestran las fibras comerciales disponibles.

**Tabla 1.1.** Recubrimientos comerciales disponibles en SPME (casa comercial Supelco).

<i>Tipo</i>	<i>Recubrimiento</i>	<i>Abreviatura</i>	<i>Grosor (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	<i>Analitos</i>
<i>Absorción</i>	Polidimetilsiloxano	PDMS	7, 30, 100	No polares
	Poliacrilato	PA	85	Polares
	Polietilenglicol	PEG	60	Polares
<i>Adsorción</i>	Carboxen-polidimetilsiloxano	CAR-PDMS	75	Polares y volátiles
	Polidimetilsiloxano-divinilbenceno	PDMS-DVB	65	Polares y volátiles
	Carbowax-divinilbenceno	CW-DVB	85	Polares
	Carbowax con resinas moldeadas	CW-TPR	85	Tensioactivos
	Divinilbenceno/Carboxen-polidimetilsiloxano	DVB-CAR-PDMS	30, 50	Polares

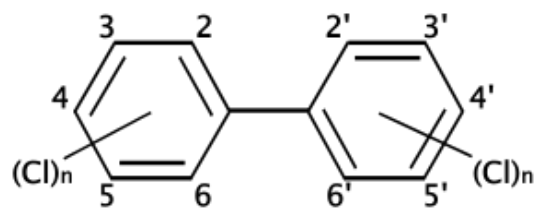
## 1.2. Bifenilos Policlorados

Los bifenilos policlorados (PCBs) pertenecen a un grupo de compuestos cuya estructura consta de entre 2 y 10 átomos de cloro (figura 1.3.) unidos a una estructura de bifenilo con un total de 209 congéneros. Se usa el término homólogo para definir a las estructuras con el mismo número de átomos de cloro (triclorado, tetraclorado...). Hay dos nomenclatura en uso:

- IUPAC: Nombra la molécula en función de la posición de los cloros. Si hay un anillo con cloro en posiciones 3, 4, 5 y en el otro anillo, en 2', 3', 4', la nomenclatura correspondiente sería 2, 3, 3', 4, 4', 5'-hexaclorobifenilo. Hay una variación del modelo IUPAC que nombra las posiciones de cloro de cada anillo por separado y a veces suprimiendo las comas y la denominación prima para facilitar su escritura en el caso anterior, sería (234-3'4'5 o 234-345) hexaclorobifenilo [5].

## Introducción

- Número BZ: propuesto por Ballschmitter y Zell en 1980, en esta nomenclatura, a cada congénero se le atribuye un número en base a la posición de los cloros en cada anillo y aumenta a medida que aumenta la cloración. Así, se nombran de PCB-1 a PCB-209 y, a pesar de la facilidad de nomenclatura, puede llevar a la confusión a la hora de determinar su estructura química exacta [5]. En la Tabla 1.2. se describe la nomenclatura BZ según la posición de los átomos de cloro



En la Figura 1.3. se muestra una estructura modelo de PCB.

**Figura 1.3.** Representa la estructura general de un bifenilo policlorado.

**Tabla 1.2.** Número BZ para los 209 congéneres de PCB.

<i>Posición de cloro</i>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>2,3</b>	<b>2,4</b>	<b>2,5</b>	<b>2,6</b>	<b>3,4</b>	<b>3,5</b>	<b>2,3,4</b>	<b>2,3,5</b>	<b>2,3,6</b>	<b>2,4,5</b>	<b>2,4,6</b>	<b>3,4,5</b>	<b>2,3,4,5</b>	<b>2,3,4,6</b>	<b>2,3,5,6</b>	<b>2,3,4,5,6</b>
<i>Ninguno</i>	1	2	3	5	7	9	10	12	14	21	23	24	29	30	38	61	62	65	116
<i>2'</i>	4	6	8	16	17	18	19	33	34	41	43	45	48	50	76	86	88	89	142
<i>3'</i>		11	13	20	25	26	27	35	36	55	57	59	67	69	78	106	108	112	160
<i>4'</i>			15	22	28	31	32	37	39	60	63	64	74	75	81	114	115	117	166
<i>2',3'</i>				40	42	44	45	56	58	82	83	84	97	98	122	129	131	134	173
<i>2',4'</i>					47	49	51	66	68	85	90	91	99	100	123	137	139	147	181
<i>2',5'</i>						52	53	70	72	87	92	95	101	103	124	141	144	151	185
<i>2',6'</i>							54	71	73	89	94	96	102	104	125	143	145	152	186
<i>3',4'</i>								77	79	105	109	110	118	119	126	156	158	163	190
<i>3',5'</i>									80	107	111	113	120	121	127	159	161	165	192
<i>2',3',4'</i>										128	130	132	138	140	157	170	171	177	195
<i>2',3',5'</i>											133	135	146	148	162	172	175	178	198
<i>2',3',6'</i>												136	149	150	164	174	176	179	200
<i>2',4',5'</i>													153	154	167	180	183	187	203
<i>2',4',6'</i>														155	168	182	184	188	204
<i>3',4',5'</i>															169	189	191	198	205
<i>2',3',4',5'</i>																194	196	199	206
<i>2',3',4',6'</i>																	197	201	207
<i>2',3',5',6'</i>																		202	208
<i>2',3',4',5',6'</i>																			209

Los congéneres sombreados son PCBs parecidos a dioxinas.

Datos obtenidos de la monografía IARC para PCBs [5].

5

## *Introducción*

La solubilidad que presentan estos compuestos abarca un rango muy amplio, desde valores muy bajos de solubilidad ( $0.0012 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), hasta valores de  $4.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para los congéneres orto-sustituídos. La diferencia puede deberse al carácter polar de estas moléculas orto-sustituídas. El logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua ( $\log K_{ow}$ ) presenta valores que oscilan entre 4.5 y 8.3, indicando una mayor afinidad por un medio orgánico. Los congéneres menos clorados tienen una mayor presión de vapor ( $9.14\cdot 10^{-2} \text{ Pa}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  para el PCB-18) que los más clorados ( $4.74\cdot 10^{-5} \text{ Pa}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), siendo los primeros los más abundantes en la atmósfera [5,6].

Entre los años 1929 y 1979 se llevó a cabo un abuso importante de PCBs como diluyentes en pesticidas, lubricantes y pinturas, entre otras aplicaciones. Debido a su uso generalizado y su alta persistencia, experimentaron una dispersión generalizada en el medio ambiente, sobre todo en el suelo. A pesar de la baja solubilidad de los PCBs en agua, esta cumple un papel importante como medio de transporte, y además implica que se acumulan en la cadena trófica y amplifican en los organismos vivos [7]. Los PCBs pueden introducirse en el organismo a través del aire inhalado, por medio de la comida y el agua, pero también por vía transdérmica. Son absorbidos y debido a su carácter lipofílico, se acumulan fácilmente en tejidos ricos en grasa, leche materna o hígado [8].

La exposición prolongada a PCBs se ha asociado a un aumento de riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer, como gastrointestinales, de hígado y de piel. También se encuentran implicados en ciertas degeneraciones neurológicas, de hecho, recientemente se han determinado mayores concentraciones de PCBs en personas que tienen Parkinson [9]. Los PCBs son clasificados como disruptores endocrinos, asociándose a problemas de fertilidad y reproducción, tasas de crecimiento reducidas, y deficiencia del sistema inmune [10].

## 1.3. Determinación analítica

Es por todo ello que nace la necesidad de desarrollar técnicas analíticas para la monitorización de estos compuestos. De entre los muchos trabajos descritos en la bibliografía, caben destacar una serie de técnicas de extracción y microextracción comúnmente utilizadas. Entre ellas se encuentran extracción en cartuchos como extracción en fase sólida (SPE) [11], microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) [12], extracción en fase sólida miniaturizada asistida por imanes (M-D- $\mu$ SPE) [13], y con mayor frecuencia, la SPME. En la tabla 1.3. se muestran algunos trabajos recientes de la bibliografía que determinan PCBs haciendo uso de fibras de distinta naturaleza.

**Tabla 1.3.** Aplicaciones analíticas para la determinación de PCBs en aguas por medio de SPME

Recubrimiento	Rango de trabajo (ng·L <sup>-1</sup> )	Temp. de extracción (°C)	Tiempo de extracción (minutos)	Método analítico	Ref
MIL-88	5-200	60	50	GC <sup>b</sup> -MS <sup>c</sup>	[14]
PDMS <sup>a</sup>	100-8000	100	30	GC <sup>b</sup> -MS <sup>c</sup>	[15]
PDMS <sup>a</sup>	0.1-86.5	75	60	GC <sup>b</sup> -MS-MS <sup>c</sup>	[16]
PDMS <sup>a</sup> -DVB <sup>d</sup>	-	100	60	GC <sup>b</sup> -MS-MS <sup>c</sup>	[16]
Hidroxifullereno	0.5-2000	80	30	GC <sup>b</sup> -ECD <sup>e</sup>	[17]
PDMS <sup>a</sup>	5-1000	80	60	GC <sup>b</sup> -MS <sup>c</sup>	[18]
PDMS <sup>a</sup>	-	78	33	GC <sup>b</sup> -MS <sup>c</sup>	[19]
PDMS <sup>a</sup>	-	95	60	GC <sup>b</sup> -ECD <sup>e</sup>	[20]
PDMS <sup>a</sup>	-	85	50	GC <sup>b</sup> -ECD <sup>e</sup>	[21]

<sup>a</sup>Polidimetilsiloxano

<sup>b</sup>cromatografía de gases

<sup>c</sup>espectrometría de masas

<sup>d</sup>Polidimetilsiloxano - divinilbenceno

<sup>e</sup>detector de captura electrónica

# Capítulo 2: Objetivos

---

## 2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo de fin de grado es el desarrollo de una metodología analítica para la determinación de PCBs en aguas haciendo uso de un método de microextracción que permita miniaturizar y automatizar el proceso. Para alcanzar este objetivo general se plantean asimismo los siguientes objetivos parciales:

- Realizar una exhaustiva búsqueda bibliográfica en fuentes adecuadas relativas al tema de trabajo, y extraer la información más relevante para el presente Trabajo de Fin de Grado.

- Comprender los conceptos que rigen la SPME y aplicar eficientemente la técnica en medidas de espacio en cabeza (HS).

- Manejar adecuadamente y optimizar las variables más significativas de un equipo de cromatografía de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas.

- Optimizar un método de HS-SPME-GC-MS para la determinación de un grupo de PCBs presentes en agua.

- Desarrollar y validar la citada metodología analítica HS-SPME-GC-MS.



# Capítulo 3: Procedimiento experimental

---

## 3. Experimental

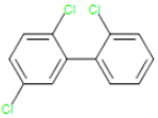
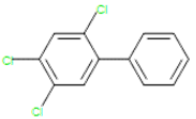
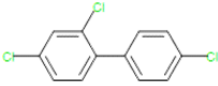
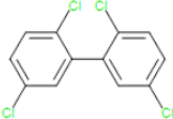
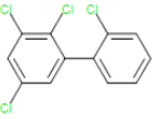
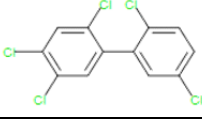
### 3.1. Materiales

Un total de 12 PCB fueron sometidos a estudio: PCB-18, PCB-28, PCB-31, PCB-52, PCB-44, PCB-101, PCB-149, PCB-118, PCB-153, PCB-141, PCB-180 y PCB-194. Un mix conteniendo todos los PCBs en isooctano fue adquirido en Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Alemania). La tabla 3.1. incluye las estructuras de todos ellos, así como algunos parámetros físico-químicos relevantes.

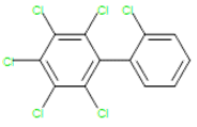
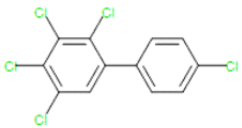
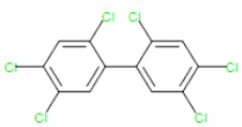
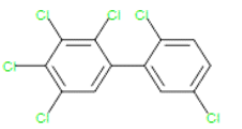
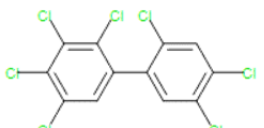
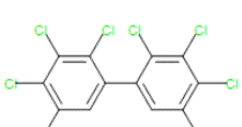
La SPME se realizó en viales de topacio de 7 mL provistos de tapones con septum de la marca Supelco (Bellefonte, PA, USA), utilizando un termómetro Selecta (Abrera, Barcelona, España), en una placa calefactora con agitación magnética RCT Basic de la marca IKA (Staufen, Alemania). Las barritas agitadoras magnéticas utilizadas, fueron de la marca Sigma Aldrich (San Luis, MO, Estados Unidos).

Las disoluciones fueron realizadas en isooctano de calidad GC-MS de la marca VWR (Radnor, PA, Estados Unidos) y etanol LiChrosolv de Merck (Darmstadt, Alemania). Los estándares acuosos sometidos a determinación se realizaron en agua desionizada, Milli-Q de grado ultrapuro, que se obtuvo mediante un sistema de purificación de agua A10 MilliPore (Watford, Reino Unido). En el procedimiento de microextracción también se empleó NaCl de Sigma Aldrich para el ajuste de la fuerza iónica.

**Tabla 3.1.** Nomenclatura, estructuras y algunas propiedades físico químicas de los PCBs sometidos a estudio.

Nombre	Abreviatura	Estructura	Peso molecular (g·mol <sup>-1</sup> )	Volumen molar (cm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> )	Punto de ebullición (°C)	Presión de vapor (kPa, 25 °C)	Log K <sub>ow</sub> <sup>a</sup>
2, 2', 5 – triclorobifenilo	PCB 18		257.54	204.7	337	0.91	5.500
2, 4, 5 – triclorobifenilo	PCB 31		257.54	204.7	337	0.42	5.503
2, 4, 4' – triclorobifenilo	PCB 28		257.54	204.7	337	0.23	5.500
16 2, 2', 5, 5' - tetraclorobifenilo	PCB 52		291.99	219.6	360	0.20	6.025
2, 2', 3, 5 – tetraclorobifenilo	PCB 44		291.99	219.6	360	0.15	6.025
2, 2', 4, 5, 5'- pentaclorobifenilo	PCB 101		326.43	234.5	381	3.28	6.404

**Continuación Tabla 3.1.** Nomenclatura, estructuras y algunas propiedades físico químicas de los PCBs sometidos a estudio.

<b>Nombre</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Estructura</b>	<b>Peso molecular (g·mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Volumen molar (cm<sup>3</sup>·mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Punto de ebullición (°C)</b>	<b>Presión de vapor (kPa, 25 °C)</b>	<b>Log K<sub>ow</sub><sup>a</sup></b>
2, 2', 3, 4, 5, 6 – hexaclorobifenilo	PCB 149		360.88	249.4	400	1.15	6.991
2, 3, 4, 4', 5 – pentaclorobifenilo	PCB 118		326.43	234.5	381	1.47	6.404
2, 2', 4, 4', 5, 5' – hexaclorobifenilo	PCB 153		360.88	249.4	400	56.6	6.991
2, 2', 3, 4, 5, 5' – hexaclorobifenilo	PCB 141		360.88	249.4	400	82.8	6.991
2, 2', 3, 4, 4', 5, 5' – heptaclorobifenilo	PCB 180		395.32	264.3	417	14.0	7.359
2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 5' – octaclorobifenilo	PCB 194		429.77	279.2	432	474	7.916

<sup>a</sup>Coeficiente de reparto octanol/agua.

Datos obtenidos del trabajo de revisión de J. Paasivirta y S.I. Sinkkonen [6]

## Introducción

Todas las fibras empleadas en el proceso de SPME fueron adquiridas en la casa Supelco. En la tabla 3.2., se incluyen algunas características importantes de cada una de ellas.

**Tabla 3.2.** Características de las fibras comerciales utilizadas para la determinación de PCBs.

<i>Fibra</i>	<i>Abreviatura</i>	<i>Grosor (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	<i>Temperatura de acondicionamiento (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</i>	<i>Tiempo de acondicionado (h)</i>
<i>Poliacrilato</i>	PA	85	280	1
<i>Polidimetilsiloxano</i>	PDMS	100	250	0.5
<i>Polidimetilsiloxano-divinilbenceno</i>	PDMS/DVB	65	250	0.5
<i>Carboxen-polidimetilsiloxano</i>	CAR/PDMS	75	300	1

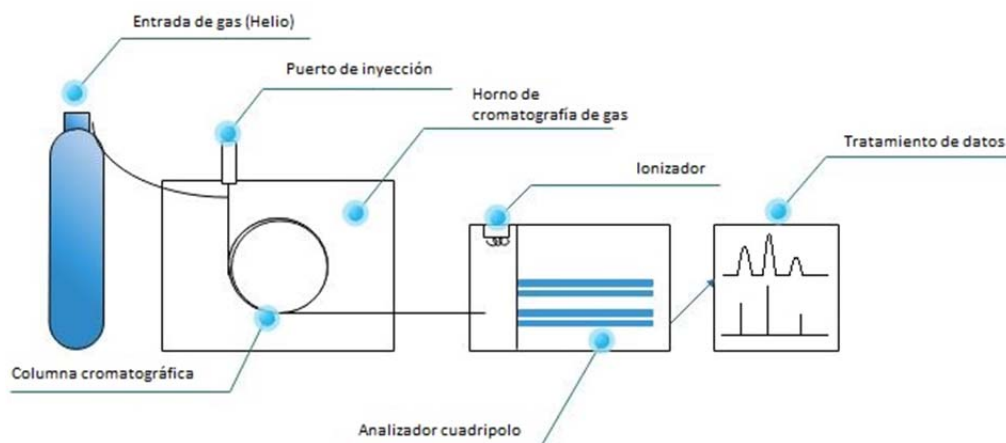
### 3.2. Instrumentación

El análisis de las muestras se realizó con un cromatógrafo de gases (GC) acoplado a un espectrómetro de masas (MS) Agilent Technologies (Santa Clara, CA, Estados Unidos) (modelos 7820A y 5977B, respectivamente) y usando helio como gas portador a una velocidad de  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los datos obtenidos fueron tratados con el software Agilent MassHunter. Para los estudios iniciales, se usó la columna 7650A Automatic Liquid Sampler de Agilent Technologies. El inyector estaba a  $300^{\circ}\text{C}$  para permitir la completa volatilización de los analitos, y el detector a  $150^{\circ}\text{C}$  para asegurar la ionización. Para la correcta separación de los analitos sometidos a estudio, fue necesaria una rampa de temperatura, descrita en tabla 3.3.

**Tabla 3.3.** Rampa de temperatura utilizada en el GC

<i>Tiempo inicial (min)</i>	<i>Velocidad (<math>^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}</math>)</i>	<i>Temperatura (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</i>	<i>Tiempo total (min)</i>
0	0	60	1
1	20	175	6.75
6.75	5	250	21.75
21.75	0	250	24.75
31.75	10	320	31.75

En la figura 3.1. se muestra un esquema general de las partes de las que consta el instrumento utilizado para el análisis.

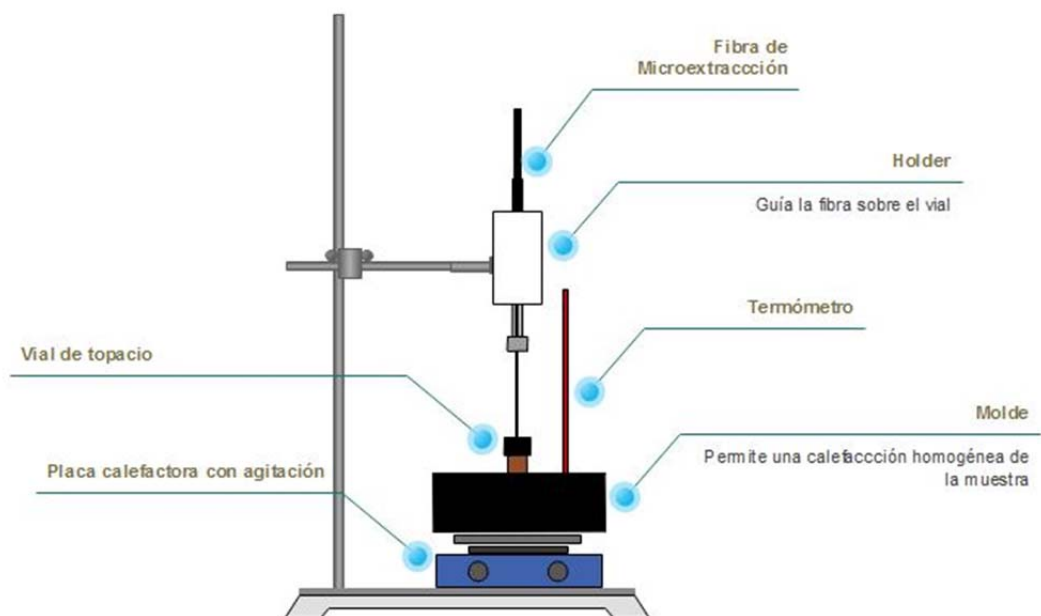


**Figura 3.1.** Esquema general de las partes de las que consta el GC-MS empleado para la determinación de PCBs.

### 3.3. Procedimiento

La metodología llevada a cabo para la determinación de PCBs consistió en un procedimiento de HS-SPME en combinación con GC-MS. En un vial de topacio de 7ml se introdujeron 3 mL de una muestra acuosa con los analitos de interés (los PCBs) y se someten a una agitación suave (400 rpm) y a una temperatura de 80 °C. En el espacio en cabeza se expone 1 cm de la fibra comercial PDMS-DVB durante un tiempo de exposición de 1 hora. Tras este tiempo, se retrae la fibra y se lleva al equipo de análisis (GC-MS), donde se introduce la fibra en el inyector durante un tiempo de desorción de 2 minutos.

En la figura 3.2. se incluye un esquema del sistema en el que se llevó a cabo la extracción de los PCBs por medio de HS-SPME.



**Figura 3.2.** Sistema empleado para la extracción de los analitos por medio de HS-SPME.

# Capítulo 4: Resultados y Discusión

---



## 4. Resultados y discusión

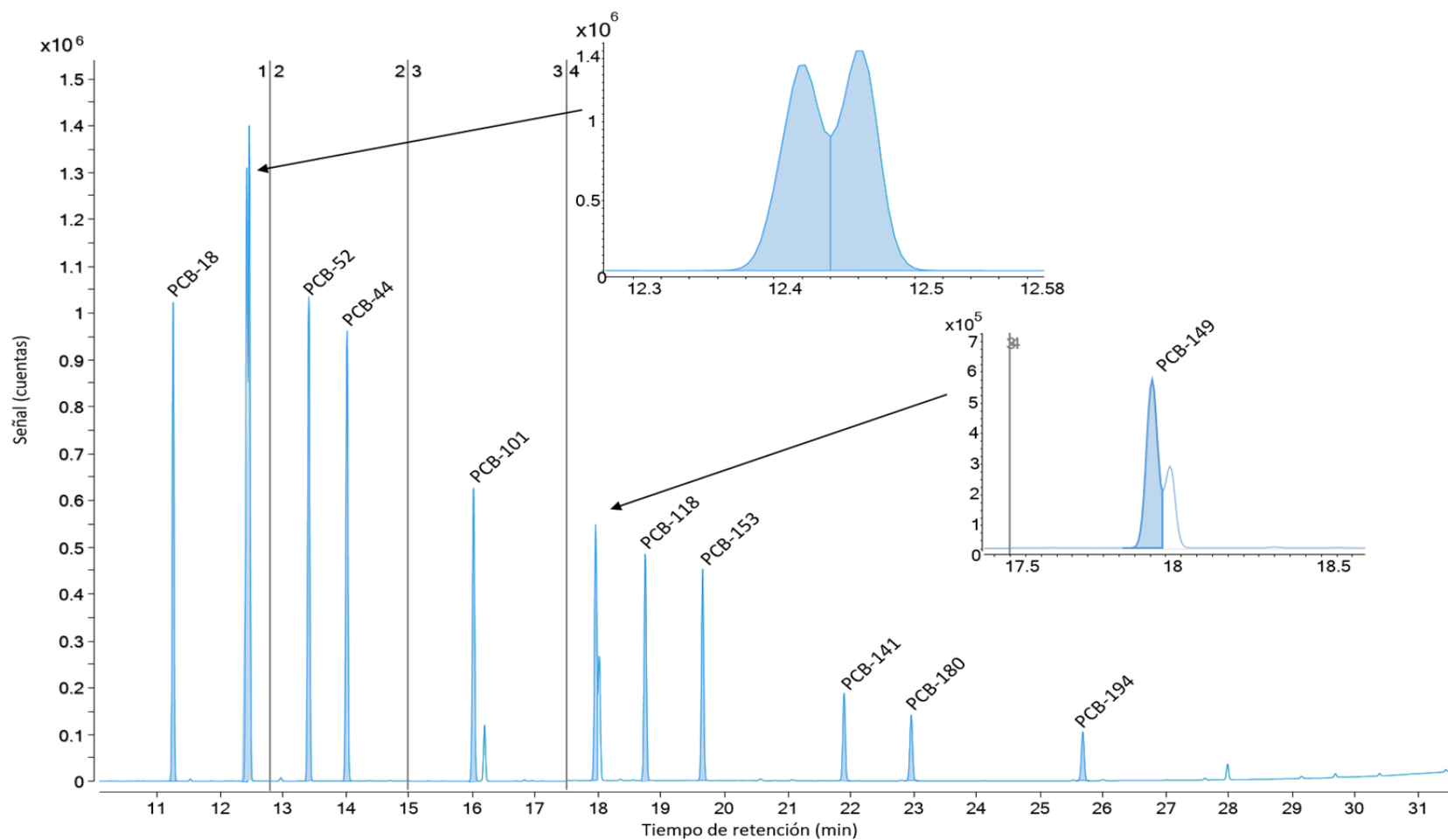
### 4.1. Método cromatográfico

Para la separación, identificación y cuantificación de los PCBs estudiados se utilizó un GC-MS, con helio como gas portador (flujo 1 mL·min<sup>-1</sup>). Las condiciones de separación se optimizaron para asegurar la resolución de todos los PCBs, y se muestra en la Sección 3.2.. En la tabla 4.1. se muestran los tiempos de retención de cada PCB en las condiciones óptimas, así como los fragmentos de MS seleccionados para la identificación y cuantificación. Asimismo, la figura 4.1. muestra la separación obtenida en las condiciones optimizadas.

**Tabla 4.1.** Tiempos de retención de los PCBs en las condiciones óptimas de GC-MS, así como las relaciones masa/carga seleccionadas para la identificación y cuantificación de los mismos en el MS, en los distintos segmentos estudiados.

<i>PCB</i>	<i>t<sub>retención</sub> ± SD<sup>a</sup> (min)</i>	<i>Ion cuantificador</i>	<i>Ion/es cualificador/es</i>
<b>Segmento 1</b>			
<i>PCB-18</i>	11.251 ± 0.003	256	186
<i>PCB-28</i>	12.413 ± 0.004	256	186
<i>PCB-31</i>	12.453 ± 0.004	256	186
<b>Segmento 2</b>			
<i>PCB-52</i>	13.397 ± 0.004	292	220/255
<i>PCB-44</i>	14.001 ± 0.004	292	220/255
<b>Segmento 3</b>			
<i>PCB-101</i>	16.009 ± 0.005	326	256
<b>Segmento 4</b>			
<i>PCB-149</i>	17.950 ± 0.005	360	290
<i>PCB-118</i>	18.739 ± 0.004	326	256
<i>PCB-153</i>	19.66 ± 0.02	360	290
<i>PCB-141</i>	21.90 ± 0.03	360	290
<i>PCB-180</i>	22.96 ± 0.03	394	324
<i>PCB-194</i>	25.68 ± 0.03	430	358

<sup>a</sup>Desviación estándar en los tiempos de retención calculados (n = 20).



**Figura 4.1.** Cromatograma representativo correspondiente al conteo total de iones (TIC), obtenido en la separación óptima por GC-MS de los PCBs estudiados, extraídos de un estándar acuoso (con un contenido de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en cada PCB) y utilizando HS-SPME. La separación se alcanza en menos de 26 min.

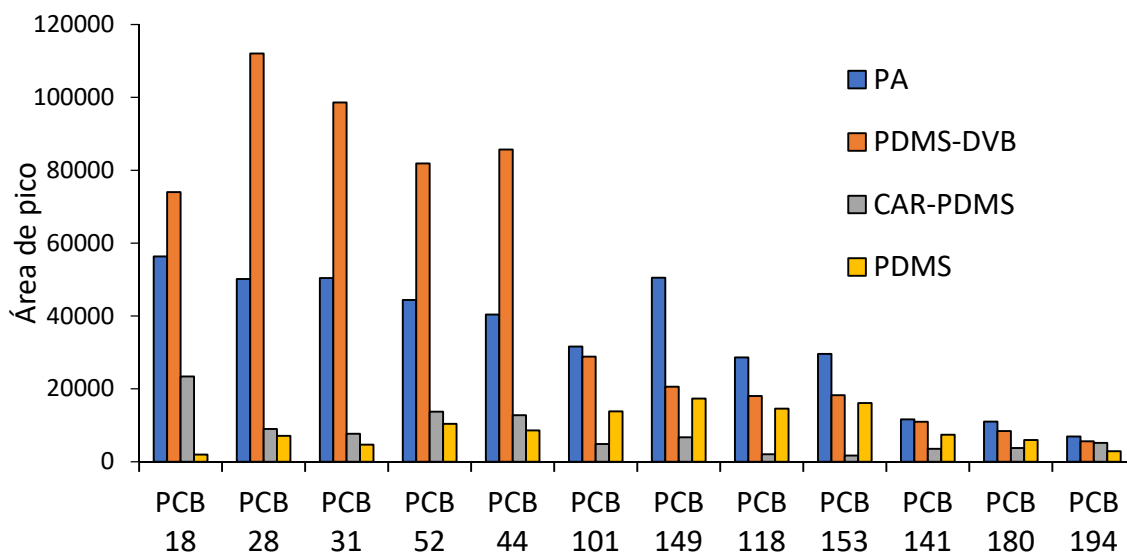
## 4.2. Optimización de la metodología de HS-SPME

Antes de abordar una exhaustiva optimización metodológica, se realizó una búsqueda bibliográfica para utilizar algunos parámetros previos como punto de partida. Así, se decidió utilizar HS- en lugar de DI-SPME, a una temperatura de 80°, por ser la más común en los estudios descritos. Además, se utilizó un volumen de muestra y estándares de 3 mL. Con estos valores prefijados, se procedió a optimizar el tiempo de extracción y desorción, el efecto de la fuerza iónica, y la naturaleza del recubrimiento de la fibra comercial de SPME para abordar el proceso.

### 4.2.1. Selección de la fibra

En primer lugar, se procedió a la elección de la fibra comercial que presentase una mayor afinidad por los PCBs. Para ello, 4 fibras de distinta naturaleza fueron evaluadas: PA de 85  $\mu\text{m}$ , PDMS-DVB de 60  $\mu\text{m}$ , CAR-PDMS de 75  $\mu\text{m}$  y PDMS de 100  $\mu\text{m}$ . En la figura 4.2. se muestran las áreas obtenidas tras aplicar el proceso de HS-SPME usando igualdad de condiciones de extracción y desorción.

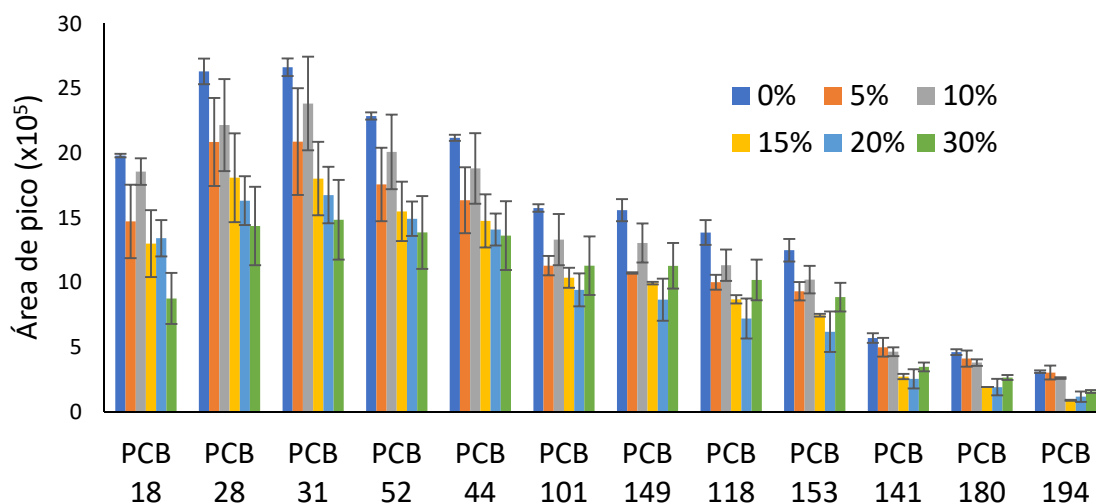
Los resultados muestran que la fibra PDMS-DVB tiene mayor eficacia para extraer los bifenilos poco clorados (de mono- a tetra-clorados). Se seleccionó por tanto la fibra PDMS-DVB como óptima para el presente estudio, no obstante, se observa que la afinidad de la misma se va perdiendo a medida que aumenta el número de átomos de cloro en la estructura del PCB.



**Figura 4.2..** Resultados de extracción obtenidos (expresados como área de pico cromatográfico) utilizando diversas fibras comerciales en la extracción de PCBs presentes en un estándar acuso (conteniendo  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en cada PCB y sin adición de sal al estándar). Las condiciones de extracción empleadas fueron: 60 min en el HS a una temperatura de  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ . La desorción se realizó durante 7 min. El resto de condiciones experimentales son las descritas en la Sección 3.3.

#### 4.2.2. Efecto de la fuerza iónica

La presencia de elevados contenidos de sales inorgánicas reduce la solubilidad de sustancias hidrófobas en las disoluciones acuosas, proceso conocido como efecto “salting-out”. Al ser menos solubles, el proceso de volatilización se ve favorecido, aumentando previsiblemente el contenido de los analitos en el HS. Se estudió por tanto el efecto de la fuerza iónica con el fin de mejorar el proceso extractivo. La figura 4.3. muestra las áreas de los PCBs a diferentes contenidos de NaCl en la disolución acuosa original.

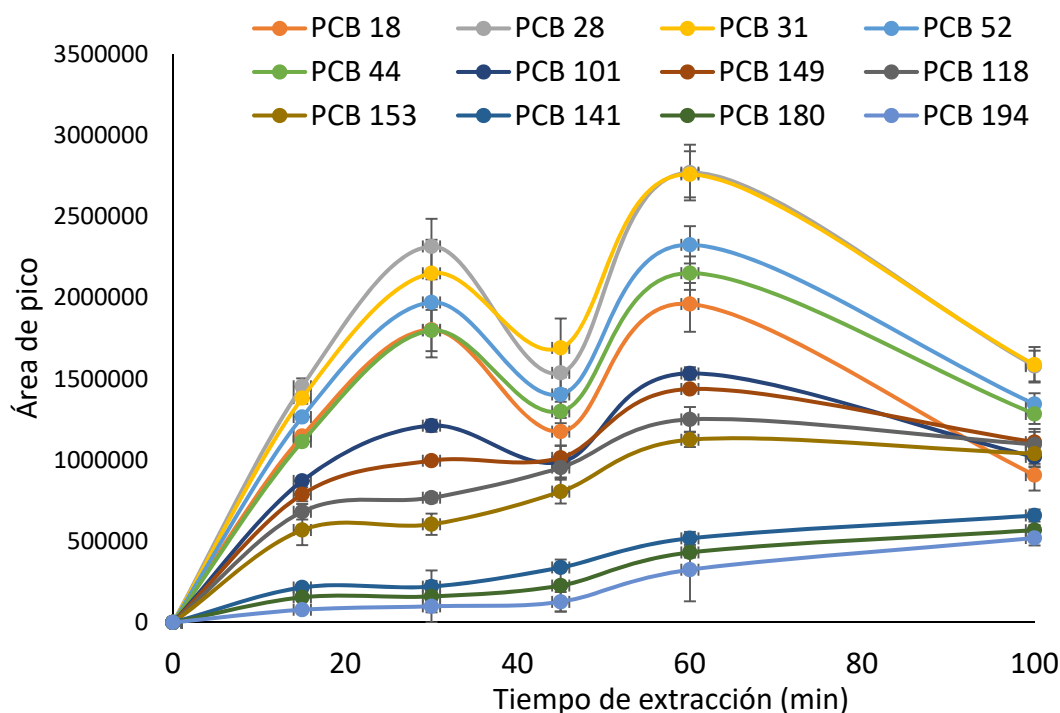


**Figura 4.3.** Influencia de la fuerza iónica en el medio acuoso como mejora del proceso extractivo en HS-SPME utilizando la fibra óptima PDMS-DVB. Se sometió a extracción estándares acuosos conteniendo  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en cada PCB y diferentes contenidos de NaCl (de 0 al 30% p/v), empleando 60 min de extracción en el HS a una temperatura de  $80^\circ\text{C}$ . La desorción se realizó durante 7 min en el inyector del GC-MS. El resto de condiciones experimentales son las descritas en la Sección 3.3.

Se observó que la adición de sal reducía la eficacia de extracción de los PCBs, por lo tanto no fue necesario el ajuste de la fuerza iónica para mejorar el método, lo que simplifica enormemente el proceso.

#### 4.2.3. Influencia del tiempo de extracción

En HS-SPME, la fibra se expone al HS donde se encuentran los analitos volatilizados durante un determinado tiempo, tiempo necesario para que se produzca la retención de los mismos en la fase estacionaria de la fibra. Se estudió por tanto el efecto del tiempo de extracción con el fin de conocer el tiempo óptimo para analizar la muestra. La figura 4.4. incluye los perfiles obtenidos, en función de los distintos tiempos de extracción empleados.



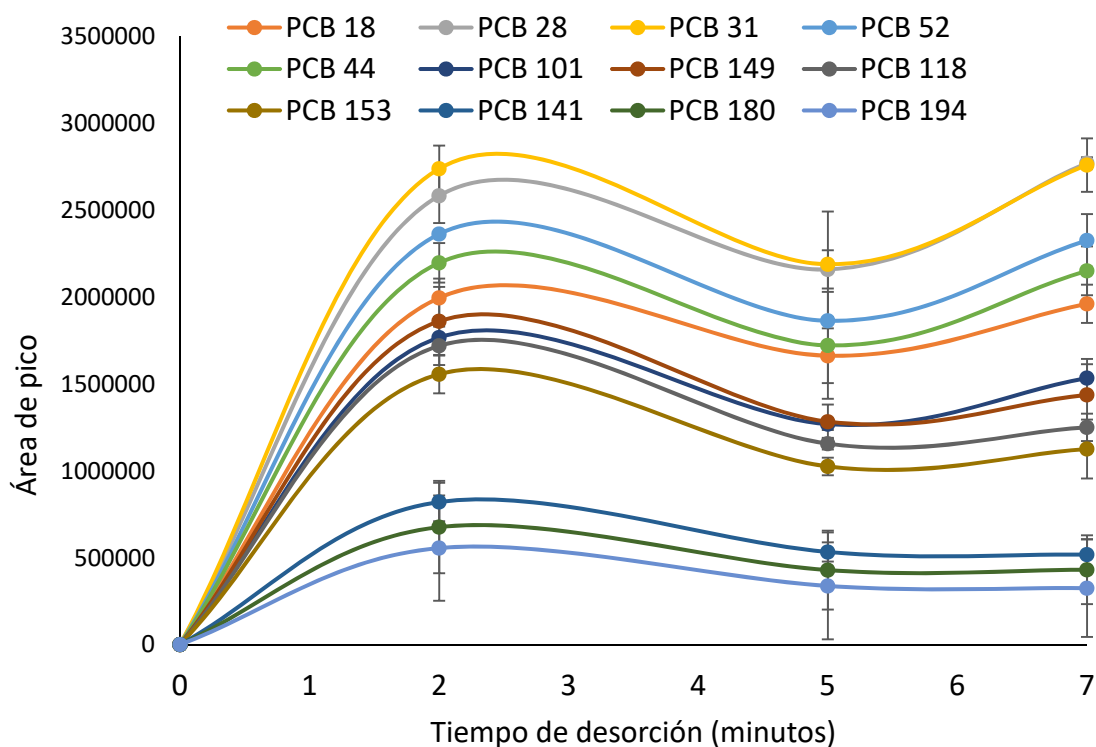
**Figura 4.4.** Perfiles correspondientes al tiempo de extracción de PCBs empleando una fibra comercial de PDMS-DVB. El estándar acuoso con una concentración de PCBs conocida ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), se sometió a extracción durante distintos tiempos extracción (15, 30, 45, 60 y 100 min) a  $80^\circ\text{C}$  con agitación constante, 0% NaCl, y una desorción de 7 min en el inyector del GC-MS. Para la estimación de errores, este procedimiento se realizó por cuadruplicado ( $n = 4$ ).

Aunque para los PCBs más clorados siguen existiendo aumentos en la eficacia de extracción hasta los 100 min, los PCBs menos clorados muestran un empeoramiento de la eficacia de extracción tras 60 min. Se escoge como situación de compromiso un tiempo de extracción en el HS de 60 min.

#### 4.2.4. Influencia del tiempo de desorción

Con el fin de reducir el tiempo de análisis y prolongar la vida útil de la fibra empleada, se estudió el tiempo de desorción de la misma en el inyector del sistema cromatográfico (la desorción se realiza a  $300^\circ\text{C}$  durante todo este tiempo). Para llevar a cabo este estudio, se

analizaron 3 estándares acuosos de PCBs con las condiciones óptimas obtenidas anteriormente (60 min de extracción en el HS a 80 °C, sin adición de sal y agitación constante) y se varió el tiempo de desorción. En la figura 4.5. se muestra el efecto del tiempo de desorción sobre los PCBs determinados.



**Figura 4.5.** Efecto del tiempo de desorción en el método HS-SPME-GC-MS utilizando las condiciones ya optimizadas para extraer un estándar acuoso con los PCBs a  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (0% NaCl, y 60 min de extracción en el HS). Se empleó una temperatura de 80. Las experiencias se realizaron por triplicado para estimar los errores.

Como se aprecia en la figura 4.5., los resultados obtenidos tras 2 min de desorción en el inyector del GC son similares a los obtenidos tras 7 min, por lo que se elige el tiempo menor para agilizar la metodología extractiva.

Para evaluar la eficacia de desorción con 2 minutos, se llevó a cabo una prueba de efecto memoria (“carry-over”) para asegurar que todos los PCBs se desorbieron adecuadamente de la fibra, no observándose restos de PCBs.

#### 4.3. Validación de la metodología de HS-SPME-GC-MS

##### 4.3.1. Calibración con el método total HS-SPME-GC-MS

La tabla 4.2. muestra los parámetros analíticos de calidad obtenidos a partir de las calibraciones de HS-SPME-GC-MS en las condiciones previamente optimizadas. Las curvas de calibración se obtuvieron representando el área de pico del cromatograma frente a la concentración de los PCBs (en  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en el estándar acuoso. Las curvas de calibración fueron lineales, con coeficientes de determinación (R) superiores a 0.9952. Los límites de detección (LOD) se calcularon con el software como 3 veces la relación señal ruido ( $3\times S/N$ ) y los límites de cuantificación (LOQ) como  $10\times S/N$ . Los LODs variaron entre  $0.46 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  para PCB-18 y  $1.53 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  para PCB-153, lo que señala la enorme sensibilidad alcanzada con la metodología.



**Tabla 4.2.** Parámetros analíticos de calidad del método de HS-SPME-GC-MS para la determinación de PCBs en agua.

<i>Analito</i>	<i>Rango de trabajo (ng·L<sup>-1</sup>)</i>	<i>n<sup>a</sup></i>	<i>R<sup>b</sup></i>	<i>S<sub>y/x</sub><sup>c</sup></i>	<i>Ordenada en el origen ± SD<sup>d</sup></i>	<i>(Pendiente ± SD<sup>d</sup>)·10<sup>4</sup></i>	<i>LOD<sup>e</sup> (ng·L<sup>-1</sup>)</i>	<i>LOQ<sup>f</sup> (ng·L<sup>-1</sup>)</i>
<i>PCB-18</i>	20 – 1000	6	0.9995	14.7	-3 ± 8	11.8 ± 0.2	0.46	1.52
<i>PCB-28</i>	20 – 1000	6	0.9995	14.3	5 ± 8	8.2 ± 0.1	0.72	2.39
<i>PCB-31</i>	20 – 1000	6	0.9991	19.2	5 ± 10	8.4 ± 0.2	0.83	2.76
<i>PCB-52</i>	20 – 1000	6	0.9991	18.0	14 ± 9	7.5 ± 0.2	1.04	3.45
<i>PCB-44</i>	20 – 1000	6	0.9975	30.5	21 ± 16	7.3 ± 0.3	1.16	3.86
<i>PCB-101</i>	20 – 600	6	0.9958	23.1	-3 ± 14	9.2 ± 0.4	0.96	3.21
<i>PCB-149</i>	20 – 600	6	0.9963	21.8	-13 ± 13	8.6 ± 0.4	1.12	3.72
<i>PCB-118</i>	20 – 600	6	0.9952	24.7	-11 ± 15	8.8 ± 0.4	1.16	3.85
<i>PCB-153</i>	50 – 600	6	0.9972	19.3	0 ± 14	9.4 ± 0.4	1.53	5.10
<i>PCB-141</i>	50 – 600	5	0.9976	18.0	4 ± 13	15.1 ± 0.6	1.10	3.67
<i>PCB-180</i>	50 – 600	5	0.9964	22.3	1 ± 16	18.2 ± 0.9	0.95	3.18
<i>PCB-194</i>	20 – 1000	5	0.9990	21.2	-10 ± 13	20.0 ± 0.5	0.91	3.03

<sup>a</sup>Niveles de calibración

<sup>b</sup>Coefficiente de determinación

<sup>c</sup>Error de la estima (desviación estándar de la regresión)

<sup>d</sup>Errores asociados a la ordenada del origen y la pendiente (respectivamente), de acuerdo con los niveles de calibración especificados en la tabla

<sup>e</sup>Límite de detección

<sup>f</sup>Límite de cuantificación

4.3.2. Reproducibilidad del método total HS-SPME-GC-MS

La precisión del método total de análisis se evaluó utilizando estándares acuosos de PCBs a dos niveles de concentración ( $80 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), no coincidentes con ningún nivel de calibración, que fueron sometidos al método total optimizado HS-SPME-GC-MS. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 4.3., y puede observarse como en todos los casos, los valores de desviación estándar relativa intra-día (RSD, en %) fueron inferiores al 13.9 % incluso al nivel de concentración más bajo utilizado.

**Tabla 4.3.** Estudio de reproducibilidad del método completo HS-SPME-GC-MS para la determinación de PCBs en aguas.

PCBs	RSD <sup>b</sup> (%)	
	Nivel 1 <sup>c</sup>	Nivel 2 <sup>d</sup>
PCB 18	5.1	9.0
PCB 28	7.2	6.7
PCB 31	2.7	7.8
PCB 52	2.7	9.6
PCB 44	2.2	8.6
PCB 101	3.1	12.4
PCB 149	5.0	14.7
PCB 118	0.4	13.6
PCB 153	0.7	13.7
PCB 141	12.5	10.8
PCB 180	13.9	10.9
PCB 194	6.5	6.6

<sup>a</sup>Desviación estándar relativa (n = 3)

<sup>b</sup>Nivel de fortificación =  $80 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$

<sup>c</sup>Nivel de fortificación =  $500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$

# Capítulo 5: Conclusiones

---

## Conclusiones

Se ha seleccionado, optimizado y puesto a punto con éxito una metodología de análisis para la determinación de un grupo de contaminantes en agua, específicamente bifenilos policlorados, de enorme interés por su elevada persistencia en el medio natural y por las consecuencias que tienen sobre la salud humana.

Se ha realizado adecuadamente una búsqueda bibliográfica en este trabajo de fin de grado para conocer tanto las características de los analitos de interés, que marcan las posibles técnicas para su determinación, así como los métodos habitualmente descritos para estos compuestos.

El método de análisis seleccionado, microextracción en fase sólida de espacio en cabeza (HS-SPME) en combinación con cromatografía de gases por espectrometría de masas (GC-MS) ha resultado adecuado para cumplir requisitos de eficacia, sensibilidad y precisión para estos compuestos.

La optimización del proceso de HS-SPME implicó un estudio en profundidad de las distintas variables experimentales que permitieron obtener los mejores resultados para la determinación de los PCBs: adecuada selección de la naturaleza de la fibra de SPME (PDMS-DVB), influencia de la fuerza iónica de la muestra acuosa (óptimo: sin sal), así como el efecto del tiempo de extracción (óptimo: 60 min) y desorción (óptimo: 2 min).

La validación del método completo de HS-SPME-GC-MS generó los siguientes parámetros analíticos de calidad: los LODs variaron entre  $0.46 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  para PCB-18 y  $1.53 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  para PCB-153 (lo que señala la alta sensibilidad del método desarrollado); y los valores de R para las curvas de calibración de todos los analitos fueron superiores a 0.9952. Por su parte, la reproducibilidad intra-día de las concentraciones calculadas con los calibrados, utilizando dos estándares acuosos con concentraciones de  $80 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ,

aportaron valores de RSD inferiores al 13.9 % incluso con el nivel de concentración más bajo estudiado (lo que señala una adecuada precisión para estos niveles y considerando que se está trabajando con analitos volátiles y semivolátiles).

Se hace necesario aún una validación total del método, estimando la validez del método completo en condiciones inter-día, y procediendo al análisis de matrices reales para evaluar el efecto matriz.

## Glosario

CAR-PDMS: Carboxen-polidimetilsiloxano

Congéneros: Distintas estructuras de PCB con el mismo número de átomos de cloro.

CW-DVB: Carbowax-divinilbenceno

CW-TPR: Carbowax con resinas moldeadas

DI-SPME: Direct immersion solid phase microextraction

DLL-ME: Microextracción líquido-líquido dispersiva

ECD: Detector de captura electrónica

GC: Cromatografía de gases

HF-SPME: Hollow fiber solid phase microextraction

HS-SPME: Head space solid phase microextraction

LOD: Límite de detección

Log  $K_{o/w}$ : Coeficiente de reparto octanol/agua

LOQ: Límite de cuantificación

M-D- $\mu$ SPE: Extracción en fase sólida miniaturizada asistida por imanes

MS: Espectrometría de masas

n: Número de puntos de calibrado

PA: Poliacrilato

PCB: Bifenilos policlorados

PDMS: Polidimetilsiloxano

PDMS-DVB: Polidimetilsiloxano-divinilbenceno

PEG: Polietilenglicol

R: Coeficiente de determinación

Rpm: Revoluciones por minuto

RSD: Desviación estándar relativa

SD: Desviación estándar

SPME: Microextracción en fase sólida (Solid Phase Microextraction)

$S_{y/x}$ : Errores asociados a la ordenada del origen y la pendiente.

## Bibliografía

- [1] Arthur, L.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, 1990, 62, 2145.
- [2] Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. Wiley-VCH Inc., New York, 1997, 264.
- [3] Prosen, H.; Zupančič-Kralj, L. Solid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.*, 1999, 18, 272.
- [4] Pawliszyn, J. Theory of Solid phase micro extraction. *J. Chromatogr. Sci.*, 2000, 38 (7), 270.
- [5] <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol107/mono107-001> Último acceso Junio 2017.
- [6] Paasivirta, J.; Sinkkonen, SI. Environmentally Relevant Properties of All 209 Polychlorinated Biphenyl Congeners for Modeling Their Fate in Different Natural and Climatic Conditions. *J. Chem. Eng. Data*, 2009, 54 (4), 1189.
- [7] <https://www.epa.gov/pcbs/learn-about-polychlorinated-biphenyls-pcb> Último acceso Junio 2017.
- [8] [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0016/123064/AQG2ndEd\\_5\\_10PCBs](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0016/123064/AQG2ndEd_5_10PCBs) Último acceso Junio 2017.
- [9] Hatcher-Martin, J.M.; Gearing, M.; Steenland, K. et al. Association between polychlorinated biphenyls and Parkinson's disease neuropathology. *Neurotox.*, 2012, 33(5), 1298.
- [10] <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=142&tid=26> último acceso Junio 2017.
- [11] Wolska, L.; Galer, K.; Górecki, T.; Namieśnik, J. Surface water preparation procedure for chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls. *Talanta*, 1999, 50 (5), 985.
- [12] Pérez-Carrera, E.; León, VM.; Parra, AG.; Mazo, EG. Simultaneous determination of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in seawater and interstitial marine water samples, using stir bar sorptive extraction–

## Bibliografia

- thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2007, *1170* (1-2), 82.
- [13] Chen, X.; Ding, N.; Zang, H. et al. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MOF core–shell magnetic microspheres for magnetic solid-phase extraction of polychlorinated biphenyls from environmental water samples. *J. Chromatogr. A*, 2013, *1304*, 241.
- [14] Wu, Y-Y.; Yang, C-X.; Yan, X-P. Fabrication of metal–organic framework MIL-88B films on stainless steel fibers for solid-phase microextraction of polychlorinated biphenyls. *J. Chromatogr. A*, 2014, *1334*, 1.
- [15] Llompart, M.; Li, K.; Fingas, M. Headspace solid-phase microextraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soils and sediments. *J. Microcolumn.*, 1999, *11*, 397.
- [16] Landin, P.; Llompart, M.; Lourido, M.; Cela, R. Determination of Tri- through Heptachlorobiphenyls in Water Samples by SPME-GC-MS-MS: Comparison of PDMS and PDMS-DVB Coatings. *J. Microcolumn.*, 2001, *13*, 275.
- [17] Yu, J.; Dong, L.; Wu, C. et al. Hydroxyfullerene as a novel coating for solid-phase microextraction fiber with sol–gel technology. *J. Chromatogr. A*, 2002, *978*, 37.
- [18] Derouiche, A.; Driss, M.R.; Morizur, J-P.; Taphanel, M-H. Simultaneous analysis of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in water by headspace solid-phase microextraction with gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2007, *1138*, 231.
- [19] Song, X.; Li, J.; Chen, L. et al. Determination of Polychlorinated Biphenyls in Seawater using Headspace Solid-Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry with the Aid of Experimental Design. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2012, *23* (1), 132.
- [20] Kowalski, CH.; da Silva, GA.; Godoy, H. et al. Application of Kohonen neural network for evaluation of the contamination of Brazilian breast milk with polychlorinated biphenyls. *Talanta*, 2013, *116*, 315.
- [21] López, R.; Goñi, F.; Etxandia, A. et al. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. *J. Chromatogr. B*, 2007, *846*, 298.